

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6482577号
(P6482577)

(45) 発行日 平成31年3月13日 (2019. 3. 13)

(24) 登録日 平成31年2月22日 (2019. 2. 22)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006. 01)

GO 1 N 33/543 5 4 5 A

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 U

GO 1 N 27/62 (2006. 01)

GO 1 N 27/62 V

請求項の数 4 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願2016-567300 (P2016-567300)
 (86) (22) 出願日 平成27年12月4日 (2015. 12. 4)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2015/084113
 (87) 国際公開番号 W02016/108267
 (87) 国際公開日 平成28年7月7日 (2016. 7. 7)
 審査請求日 平成29年6月16日 (2017. 6. 16)
 (31) 優先権主張番号 特願2014-267008 (P2014-267008)
 (32) 優先日 平成26年12月29日 (2014. 12. 29)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 501387839
 株式会社日立ハイテクノロジーズ
 東京都港区西新橋一丁目2 4 番 1 4 号
 (74) 代理人 110000350
 ポレール特許業務法人
 (72) 発明者 中川 裕章
 日本国東京都港区西新橋一丁目2 4 番 1 4
 号 株式会社日立ハイテクノロジーズ内

審査官 赤坂 祐樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析方法、及び分析装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分析対象物質を測定する分析方法であって、
 固定相上に固定化した分析対象物質に特異的に結合する、酵素が結合する抗体を結合させ、
 前記抗体に結合した前記酵素と酵素基質とを酵素反応させ、
 得られた前記酵素基質の酵素反応生成物を質量分析することにより、前記分析対象物質の
 存在の有無及び濃度を測定し、
 分析対象となる前記酵素反応生成物が、疎水性指標である logP が 1 ~ 5、分子量が 150 ~ 1,0
 00 の化合物である、
 ことを特徴とする分析方法。

【請求項 2】

請求項 1 記載の分析方法であって、
 前記酵素反応生成物が、複数の芳香族化合物が C-N 若しくは C-O の一重結合を含むリンカーで
 つながった構造であり、分子量 200 から 600 の化合物である、
 ことを特徴とする分析方法。

【請求項 3】

分析対象物質を測定する分析装置であって、
 固定相上に固定化した分析対象物質に特異的に結合する、酵素が結合する抗体を結合させ
 、前記抗体に結合した前記酵素と酵素基質とを酵素反応させる酵素反応部と、
 得られた前記酵素基質の酵素反応生成物を質量分析する質量分析部と、を備え、

10

20

前記分析対象物質の存在の有無及び濃度を測定し、
分析対象となる前記酵素反応生成物が、疎水性指標であるlogPが1～5、分子量が150～1,000の化合物である、
ことを特徴とする分析装置。

【請求項4】

請求項3記載の分析装置であって、
前記酵素反応生成物が、複数の芳香族化合物がC-N若しくはC-Oの一重結合を含むリンカーでつながった構造であり、分子量200から600の化合物である、
ことを特徴とする分析装置。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は分析方法及び分析装置に係り、特に酵素免疫法を用いた分析技術に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、生体防御タンパク質の抗体が特定の構造の物質と強く結合する抗体抗原反応を利用した免疫法が、タンパク質など生体成分の検出や定量分析に広く使われている。特に酵素反応を利用して酵素基質より生じた生成物の発色や蛍光を測定する酵素免疫法は、酵素反応により多分子の酵素反応生成物を生じ、比較的簡易に感度を得られるため広く使われている。

20

【0003】

酵素免疫法の一例として、固定相に結合した抗分析対象物質抗体に、分析対象物質を結合させ、分析対象物質を特異的に認識する標識が結合した抗分析対象物質抗体を分析対象物質に結合させ、分析対象物質に結合しなかった複合体を除去し、標識に特異的に結合する標識結合物質と酵素の複合体を標識に結合させた後、標識に結合しなかった複合体を除去し、酵素と反応する酵素基質を加えることにより、酵素反応生成物を生じさせるものがある。従来、この酵素反応生成物は、反応により吸光度や蛍光など分光的性質が大きく変化したり、若しくは更に他の物質と反応するものが選択され、酵素反応前後の吸光度や蛍光の変化を分析することにより、分析対象物質の有無や濃度を分析している。

【0004】

30

上記は一例であり、酵素免疫法では多様な手法が開発されており、固定相への分析対象物質の固定に抗体を用いず、疎水性やイオン性などの吸着、化学的な結合を用いる方法や、抗分析対象物質抗体に酵素を結合させる手法もある。用いる酵素の種類はβ-ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アセチルコリンエステラーゼ、ルシフェラーゼなど多様な酵素が本目的のため市販されている。（非特許文献1参照）

一方、質量分析装置（MS）は物質をイオン化し、真空中でのイオンの移動度を基に m/z （質量を電荷数で割った値）と強度を測定する装置である。タンパク質などの高分子を直接分析することも可能ではあるが、感度が低下することが多く、通常、生体内のタンパク質は、アルキル化、リン酸化、糖鎖付加などの翻訳後修飾を受けて分子量や荷電状態に多様性が生じ、異なる m/z で検出される。これらの理由のためMSでタンパク質を直接測定することは難しい。このためMSを用いてタンパク質を測定するには、トリプシンなどでペプチドに切断し、その中からMS検出に適したペプチドを選択して分析しており、現在、数100pg（数fmol）レベルまで検出できる。（非特許文献2、非特許文献3参照。）

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】The Immunoassay Handbook Fourth Edition, David Wild編、2013年、Elsevier出版(イギリス)

【非特許文献2】Tujin Shi他、Proteomics 12巻8号1074～1092項2012年

【非特許文献3】Daniel C Liebler他、Biochemistry 52巻3797～3806項2013年

50

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

上述した従来の比色や蛍光を利用する酵素免疫法では、試料溶液の濁りや気泡の影響を受け易く、また利用できる容器の材質に制限があった。一方、上述したMSは概して高感度に分析できるが、物質により分子量やイオン化が異なるため、分析条件や感度が大きく異なる。また、他の物質の存在により、イオン化が阻害され感度が低下するイオンサプレッションという現象が起き、感度の低下やデータの再現性が著しく低下することも多い。逆にイオン化が促進されるイオンエンハンスメントと呼ばれる現象も生じる場合もある。特に、生体試料や食品など夾雑物が多い試料の高速液体クロマトグラフ/MS(LC/MS)では、前

10

【0007】

本発明の目的は、酵素免疫法の感度を向上するとともに、タンパク質など分子量が多様な物質を精度よく分析可能な分析方法、及び分析装置を提供することにある。

【課題を解決するための手段】**【0008】**

上記の目的を達成するため、本発明においては、分析対象物質を測定する分析方法であって、固定相上に固定化した分析対象物質に特異的に結合する、酵素が結合する抗体を結

20

【0009】

また、上記の目的を達成するため、本発明においては、分析対象物質を測定する分析装置であって、固定相上に固定化した分析対象物質に特異的に結合する、酵素が結合する抗体を結合させ、抗体に結合した酵素と酵素基質とを酵素反応させる酵素反応部と、得られた酵素基質の酵素反応生成物を質量分析することにより、分析対象物質の存在の有無及び濃度を測定する分析方法を提供する。

【発明の効果】

30

【0010】

本発明により酵素免疫法を用いて高感度に分析対象物質が分析でき、また、タンパク質など多様性がある対象物質の分析が容易な装置を提供できる。

【図面の簡単な説明】**【0011】**

【図1】酵素免疫法を用いた本発明の分析法の原理を説明するための模式図である。

【図2】実施例1に係る、分析装置の一構成例を示す図である。

【図3】実施例1に係る、分析方法の操作フローの一例を示す図である。

【図4】実施例2に係る、分析方法の操作フローの一例を示す図である。

【発明を実施するための形態】

40

【0012】

以下、本発明に係る酵素免疫法における新しい方法を利用した分析方法並びに分析装置の好適な実施の形態を説明するが、まず、図1に示す酵素免疫法の一例を用いて、本発明の分析法の原理を説明する。

図1に示すように、微粒子や容器表面など固定相1に結合した抗分析対象物質抗体2に、分析試料中の分析対象物質3を結合させる。その後、洗浄し、分析試料中の夾雑物を除去する。次に分析対象物質3を特異的に認識するための標識4が結合した抗分析対象物質抗体5を、抗原体反応により、固定化した分析対象物質3に結合させる。その後、洗浄することにより、分析対象物質3に結合しなかった標識4と抗分析対象物質抗体5の複合体を除去する。続いて、標識4に特異的に結合する標識結合物質6と酵素7の複合体を加え、標識4と標

50

識結合物質6を結合させる。その後、洗浄することにより、標識4に結合しなかった標識結合物質6と酵素7の複合体を除去する。

【0013】

更に、酵素7と反応する酵素基質8を加えると、酵素基質8は酵素反応により酵素反応生成物9及び10を生じる。標識4と標識結合物質6は、ビオチンとアビジン若しくはストレプトアビジンの組合せが一例としてあげられるが、標識4を任意の化合物として標識結合物質6を抗標識抗体としたり、標識4を用いず抗分析対象物質抗体5を認識する抗分析対象物質抗体や、プロテインGやAなどの抗体結合タンパク質を用いても良い。

【0014】

酵素基質による酵素反応の具体例を以下にあげる。β-ガラクトシダーゼの反応では、p-10
-ニトロフェニル β-D-ガラクトシドが分解され、p-ニトロフェノールが遊離し、これが弱アルカリ性で呈色しこれを420nmの吸収で測定することが出来る。

【0015】

ペルオキシダーゼでは過酸化水素を分解し、これに伴って発生する活性酸素により3,3',5,5'-テトラメチルベンチジンが酸化されて酸性下で黄色を呈し、これを450nmの吸収で測定する。アルカリホスファターゼはp-ニトロフェニルリン酸を分解し、p-ニトロフェノールが生じこの405nmの吸光度を測定する。アセチルコリンエステラーゼはアセチルコリンを酢酸とチオコリンに分解する。このチオコリンが5,5'-ジチオ-ビス-(2-ニトロ安息香酸)のジスルフィド結合を開裂し、5-チオ-2-ニトロ安息香酸を生じこの412nmでの吸光度を測定する。20

【0016】

この他にもβ-ガラクトシダーゼの基質として、フェニルβ-D-ガラクトシド、p-アミノフェニルβ-D-ガラクトシド、p-メトキシフェニルβ-D-ガラクトシド、o-ニトロフェニルβ-D-ガラクトシド、p-メチルウンベリフェリルβ-D-ガラクトシド、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルβ-D-ガラクトピラノシド、5-ブromo-6-クロロ-3-インドリルβ-D-ガラクトピラノシド、5-ブromo-3-インドリルβ-D-ガラクトピラノシド、6-クロロ-3-インドリルβ-D-ガラクトピラノシド、o-ニトロフェニルβ-D-ガラクトピラノシドなどが知られている。

【0017】

ペルオキシダーゼの基質として、4-アミノアンチピリン、2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸アンモニウム)、5-アミノサリチル酸、3,5-ジクロロ-2-ヒドロキシベンゼンスルホン酸、2,4-ジクロロフェノール、N,N-ジメチルアニリン、3-ジエチルアミノトルエン、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン、2,2'-アジノジ(3-エチルベンツチアゾリジン)-6'-スルホンネート、1,2-フェニレンジアミン、3-(3,5-ジメトキシアニリノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸、2,4,6-トリブromo-3-ヒドロキシ安息香酸、チラミン、p-ヒドロキシフェニルプロピオン酸等が知られている。アルカリホスファターゼの基質として、4-メチルウンベリフェリルフォスフェート等が知られている。

【0018】

しかしながら、従来の酵素免疫法では、上述した通り、比色や蛍光を利用しており、試料溶液の濁りや気泡の影響を受け易く、また利用できる容器の材質に制限等がある。40

【0019】

そこで、本発明の酵素免疫法を利用する分析方法、及び分析装置においては、酵素と反応する酵素基質として、酵素反応生成物が質量分析装置(MS)による質量分析法で検出し易い化合物を用いる。MSにも種々あるが、エレクトロスプレーイオン化-トリプル四重極型MSがより好適である。エレクトロスプレーイオン化は電位差と噴霧ガスにより、溶液中の物質が安定してイオン化する方法である。四重極型MSの電極が3つ直列に配置されており、最初の四重極で任意のm/zのイオンを選択し、次の四重極にてそのイオンを分解し、最後の四重極で任意の分解物イオンを検出するものである。最初の四重極で他の殆どの物質がm/zの違いにより分離される。次の四重極で化合物により分解のパターンには特徴があ50

るため、最初の四重極で偶然同じ m/z で混入した化合物があっても分解生成物が異なり、最後の四重極では非常に高い選択性で特定物質の量を測定することが出来る。

【0020】

この構成のMSで検出し易い化合物とは、エレクトロスプレーでイオン化し易く、トリプル四重極型で定量し易いことである。図1に示した主な分析対象物質となる酵素反応生成物9は、酵素基質8や他の主な分析対象物質とならない酵素反応生成物10のイオンサプレッションの影響を減ずるため、液体クロマトグラフィー(LC)でこれらの成分と分離されることが望ましい。エレクトロスプレーでイオン化するときには、有機溶媒濃度が高い方が気化し易くイオン化効率が良い。LCで普及しているC18系のカラムで有機溶媒濃度が高くなる化合物は、 $\log P$ 値が1から5の化合物が好ましい。また窒素や酸素などの炭素や水素以外の酸素や窒素などヘテロ原子を含む有機化合物はイオン化し易い。

10

【0021】

MSで分析し易い二つ目の性質は、化合物間の干渉が起きないことである。化合物の質量が異なっても同位体元素の存在や付加イオン、脱水イオンなどにより質量分析では干渉する場合がある。これらを排除するためには m/z が40以上離れることが望ましい。また質量が異なるものでも同時にイオン化されるとイオンサプレッションと呼ばれる干渉を生じる可能性が高い。酵素反応では反応基質濃度を高くすることで反応速度が増加するため、検出化合物よりも反応基質が高濃度になり、検出化合物のイオン化を阻害することが予想される。

【0022】

20

本発明の酵素免疫法による分析方法の酵素反応系では、酵素は固定相に固定化されているので、酵素基質と反応生成物や緩衝液などの塩類や有機溶媒が存在する。酵素基質と検出される化合物をクロマトグラフィーなどで分離しやすくするためにも化学的性質が大きく異なることが望ましい。例えば酵素を糖分解酵素の一種である β -ガラクトシダーゼとし、酵素基質を p -ニトロフェニル β -ガラクトシドとした場合、反応生成物は検出に用いる p -ニトロフェノールと酵素に認識されるガラクトースになる。これらは極性が大きく異なりC18など疎水性クロマトグラフィーで分離し易い。またMSでの夾雑物としては試料由来の化合物の他、移動相に用いられている水やアセトニトリルなどの有機溶媒、アンモニアやギ酸などの緩衝液成分やこれらが数分子集まったクラスターなどがある。これらを回避するには m/z が150以上であることが望ましい。しかし質量が大きくなると多価イオンが発生し易く解析が難しくなるため、分子量1,000以下の化合物が好ましい。

30

【0023】

以上を勘案すると、本発明における酵素免疫法による分析方法において、酵素反応により生じるMS分析対象物である酵素反応生成物は、疎水性指標である $\log P$ が1~5、分子量が150~1,000の化合物であることが望ましい。更にトリプル四重極型MSでは、2番目の四重極で化合物を分解し、その分解パターンが化合物毎に異なることを利用して分析精度を高めている。低分子では分解が起こりにくく、また大きな分子では分解が複雑になりすぎ解析が難しくなる場合がある。複数の芳香族化合物が、C-N若しくはC-Oの一重結合を含むリンカーでつながった構造が安定した分解を起こし易い。これらを勘案し、本発明の分析方法、及び分析装置では、MS分析対象物である酵素反応生成物は、複数の芳香族化合物がC-N若しくはC-Oの一重結合を含むリンカーでつながった構造であり、分子量200から600の化合物であることが望ましい。例えば、酵素反応生成物の一例として、ペラパミル(C27H38O4、分子量 454.61)を利用する。

40

【実施例1】

【0024】

続いて、図2、図3を用いて、本発明の分析方法、及び分析装置の第1の実施例を説明する。

【0025】

本実施例は、固定相上に固定化した分析対象物質に特異的に結合する、酵素が結合する抗体を結合させ、抗体に結合した酵素と酵素基質とを酵素反応させ、得られた酵素基質の

50

酵素反応生成物を質量分析することにより、分析対象物質の存在の有無及び濃度を測定する分析方法の実施例である。また、固定相上に固定化した分析対象物質に特異的に結合する、酵素が結合する抗体を結合させ、抗体に結合した酵素と酵素基質とを酵素反応させる酵素反応部と、得られた酵素基質の酵素反応生成物を質量分析する質量分析部と、を備え、分析対象物質の存在の有無及び濃度を測定する分析装置の実施例である。

【 0 0 2 6 】

図2で示す実施例1に係る自動分析装置は、点線で示したLC/MS71で構成される質量分析部と、それ以外の構成要素で構成されるが、本明細書においては、質量分析部以外の構成要素を、酵素反応部と総称することとする。この酵素反応部において、固定相上に固定化した分析対象物質に特異的に結合する、酵素が結合する抗体を結合させ、抗体に結合した

10

【 0 0 2 7 】

図2に示すように、酵素反応部において、血清や標準溶液などの検体は、検体供給部20にある検体容器21から、検体分注装置22で一定量を反応テーブル30上にある反応容器31に移される(図3の操作フローのS1、以下同じ)。反応容器31への検体分注装置22は、ノズル洗浄機構23で洗浄する。反応テーブル30の外周には複数の反応容器が保有できるようになっており、反応テーブル30の回転運動により反応容器31が任意の操作部に移動できる。また反応テーブル30には適宜、恒温機能、攪拌機能、磁気捕集機能などを追加できる。反応テーブル30上の反応容器31は、反応容器移送部40の働きで反応容器ストッカー41より供給される。また反応容器各々には予め分析対象物質3に特異的な抗分析対象物質抗体2を結合

20

【 0 0 2 8 】

検体が入れられた反応テーブル30上の反応容器31は、一定時間後に吸引ノズル32の作業部に移送され(S2)、反応後の上清を吸引除去される(S3)。吸引ノズル32はノズル洗浄機構33で洗浄する。次に反応容器31は洗浄液供給ノズル34の作業部に移送され洗浄液を入れる(S4)。洗浄液供給ノズル34はノズル洗浄機構35で洗浄する。反応容器31は吸引ノズル作業部と洗浄液供給ノズル作業部を往復し複数回の洗浄を行う(S4,5)。

【 0 0 2 9 】

洗浄された反応容器31は試薬供給ノズル50の作業部に移送され、試薬容器51から標識4と抗分析対象物質抗体5の複合体が入れられる(S6)。試薬供給ノズル50はノズル洗浄機構52で洗浄される。試薬テーブル53には複数の試薬容器51が収納されており、適宜恒温機能や攪拌機能が具備される。反応容器31は一定時間後に吸引ノズル32の作業部に移送され(S7)、反応後の上清を吸引除去される(S8)。反応容器31は吸引ノズル作業部と洗浄液供給ノズル作業部を往復し複数回の洗浄を行う(S9,10)。

30

【 0 0 3 0 】

その後、試薬供給ノズル50の作業部に移動し、標識結合物質6と酵素7の複合体を入れられる(S11)。反応容器31は一定時間後に吸引ノズル32の作業部に移送され(S12)、反応後の上清を吸引除去される(S13)。反応容器31は吸引ノズル作業部と洗浄液供給ノズル作業部を往復し複数回の洗浄を行う(S14,15)。

【 0 0 3 1 】

40

その後、反応容器31は、試薬供給ノズル50の作業部に移動し、酵素基質8を入れられる(S16)。反応容器31は一定時間後に試料注入ノズル機構60の作業部に移動し(S17)、一定量をLC/MS試料注入部70を通して、質量分析部であるLC/MS71で分析される(S18)。試料注入ノズル機構60は洗浄機構61で洗浄される。酵素基質8を入れ一定時間経過後、直ちに分析を開始できない場合には、試薬供給ノズル50にて酵素反応停止液を入れた後、試料注入ノズル機構60にて、分析試料テーブル62上の分析試料容器63に一旦保持され、順次、質量分析部を構成するLC/MS71で分析される。試料注入が終了した反応容器31は反応容器移送部40により、終了反応容器収納部42に移送される。

【 0 0 3 2 】

以上説明した実施例1の自動分析装置、及び分析方法によれば、酵素免疫法により高感

50

度で分析対象が分析でき、MSを用いてタンパク質など多様性がある物質の分析を容易に行うことができる。

【実施例 2】

【0033】

先に説明したように、酵素免疫法には多くの手法があり、実施例 2 として、実施例 1 の分析方法と異なり、標識を用いず抗分析対象物質抗体を認識する抗分析対象物質抗体を用いた場合の実施例を説明する。図4に実施例2の分析方法の操作フローを示す。なお、図4に示す操作フロー中、図3と同一の符号を有するものは同一の操作を示しており、本操作フローも図2に示した自動分析装置を用いて実現できる。

【0034】

同図に見るように、複数回の洗浄(S4,5)が実施された反応容器31は試薬供給ノズル50の作業部に移送され、本実施例においては、抗分析対象物質抗体5と酵素7の複合体が反応容器31に入れられる(S19)。その後、実施例 1 と同様、反応容器31は一定時間後に吸引ノズル32の作業部に移送され(S12)、反応後の上清を吸引除去される(S13)。反応容器31は吸引ノズル作業部と洗浄液供給ノズル作業部を往復し複数回の洗浄を行う(S14,15)。その後、反応容器31は、試薬供給ノズル50の作業部に移動し、酵素基質8が入れられ、酵素反応が行われる(S16)。反応容器31は一定時間後に試料注入ノズル機構60の作業部に移動し(S17)、一定量をLC/MS試料注入部70を通して質量分析部であるLC/MS71で分析される(S18)。

【0035】

本実施例によれば、標識を使用しないので、分析手順の簡略化を計ることができる。また、実施例 1 と同様、酵素免疫法により高感度で分析対象が分析でき、MSを用いてタンパク質など多様性がある物質の分析を容易に行うことができる。

【0036】

続いて、以上説明した各種の実施例を適用して分析を行った分析例を順次説明する。

【0037】

<分析例1>

分析例2-5の分析に先立ち、分析例 1 として、酵素7であるガラクトシダーゼに、酵素基質8として、p-ニトロフェニルβ-ガラクトシド、4-メチルウンベリフェリル-β-ガラクトシド、β-ガラクトシドのペラパミル誘導体をそれぞれ反応させ、反応生成物をそれぞれ質量分析部であるLC/MS、及び分光分析装置にて分析した。酵素反応生成物の一つである4-ニトロフェノール(C₆H₅NO₃、分子量 139.11)は、LC/MSで分光と同等の検出感度が得られる。反応生成物の一つである4-メチルウンベリフェロン(C₁₀H₈O₃、分子量 176.171)は、LC/MSで分光より高感度で検出できる。更に、反応生成物の一つであるペラパミル(C₂₇H₃₈O₄、分子量 454.61)は、LC/MSで非常に高感度に検出できる。

【0038】

<分析例2>

本分析例は、図2を使って説明した実施例 1 に関する分析例である。検体である分析対象物質3である、ヒト血清アルブミンを緩衝液に50pg/mLから20ng/mLの濃度範囲で溶解し、抗分析対象物質抗体2である抗ヒト血清アルブミン抗体をコートした反応容器31に50μLを分注する。続いて、抗分析対象物質抗体5と標識4の複合体であるビオチン標識抗ヒト血清アルブミン抗体溶液を100μL反応容器31に入れ、1時間インキュベートする。その後上清を吸引し、反応容器31をトリス緩衝生理食塩水で3回洗浄する。この容器31に、標識結合物質6と酵素7の複合体としてのストレプトアビジンガラクトシダーゼ複合体溶液を100μL加え、1時間インキュベートする。その後上清を吸引し、トリス緩衝生理食塩水で3回洗浄する。これに、酵素基質8であるp-ニトロフェニルβ-ガラクトシド、4-メチルウンベリフェリル-β-ガラクトシドをそれぞれ反応させ、反応生成物をそれぞれLC/MS、及び分光分析装置にて分析した。

【0039】

<分析例3>

本分析例は、図2を使って説明した実施例 1 に関する分析例である。検体である分析対

10

20

30

40

50

象物質3、ヒト血清アルブミンを緩衝液に50pg/mLから20ng/mLの濃度範囲で溶解し、抗分析対象物質抗体2である抗ヒト血清アルブミン抗体をコートした反応容器31に50μLを分注する。標識4と抗分析対象物質抗体5の複合体であるビオチン標識抗ヒト血清アルブミン抗体溶液を100μL入れ、1時間インキュベートする。その後上清を吸引し、トリス緩衝生理食塩水で3回洗浄する。この反応容器31に標識結合物質6と酵素7の複合体であるストレプトアビジンガラクトシダーゼ複合体溶液を100μL/well加え、1時間インキュベートする。その後上清を吸引し、トリス緩衝生理食塩水で3回洗浄する。これに酵素基質8であるβ-ガラクトシドのベラパミル誘導体を反応させ、反応生成物をそれぞれ高速液体LC/MSで分析した。

【0040】

10

<分析例4>

本分析例は、図2を使って説明した実施例1に関する分析例である。検体である分析対象物質3、ヒトC反応性タンパクを緩衝液に50pg/mLから16ng/mLの濃度範囲で溶解し、抗分析対象物質抗体2である抗ヒトC反応性タンパク抗体をコートした反応容器31に50μLを分注し2時間インキュベートする。その後上清を吸引し、200μLの洗浄液で5回洗浄する。標識4と抗分析対象物質抗体5の複合体として50μLのビオチン化抗ヒトC反応性タンパク抗体を加え、30分間インキュベートする。その後上清を吸引し、200μLの洗浄液で5回洗浄する。この反応容器31に標識結合物質6と酵素7の複合体であるストレプトアビジンガラクトシダーゼ複合体溶液を50μL加え、30分間インキュベートする。その後上清を吸引し、200μLの洗浄液で5回洗浄する。これに酵素基質8であるp-ニトロフェニルβ-ガラクトシド、4-メチルウンベリフェリル-β-ガラクトシド、β-ガラクトシドのベラパミル誘導体をそれぞれ反応させ、反応生成物をそれぞれ高速液体LC/MS、及び分光分析装置にて分析した。

20

【0041】

<分析例5>

本分析例は、図3を使って説明した実施例2に関する分析例である。検体である分析対象物質3、ウサギIgGを緩衝液に2pg/mLから100ng/mLの濃度範囲で溶解し、その溶液100μLに抗分析対象物質抗体2である抗ウサギIgG抗体をコートした固定相1としての磁性粒子を懸濁し1時間インキュベートする。その後磁石にて磁性粒子を捕集し、その後上清を吸引し、200μLの洗浄液で5回洗浄する。続いて抗分析対象物質抗体5と酵素7の複合体として、100μLのガラクトシダーゼ結合抗ウサギIgG抗体を加え、1時間インキュベートする。その後磁石にて粒子を捕集し、その後200μLの洗浄液で5回洗浄する。これに酵素基質8であるp-ニトロフェニルβ-ガラクトシド、4-メチルウンベリフェリル-β-ガラクトシド、β-ガラクトシドのベラパミル誘導体をそれぞれ反応させ、反応生成物をそれぞれLC/MS、及び分光分析装置にて分析した。

30

【0042】

以上説明した本発明の分析方法、及び分析装置によれば、生体成分を高感度で分析することにより、臨床検査項目の拡大及び精度が向上する。

【0043】

なお、本発明は上記した実施例に限定されるものではなく、様々な変形例が含まれる。例えば、上記した実施例は本発明のより良い理解のために詳細に説明したのであり、ある実施例の構成の一部を他の実施例の構成に置き換えることが可能であり、また、ある実施例の構成に他の実施例の構成を加えることが可能である。また、各実施例の構成の一部について、他の構成の追加・削除・置換をすることが可能である。

40

【符号の説明】

【0044】

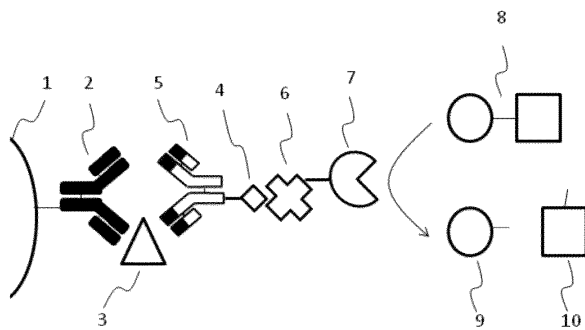
1...固定相, 2...抗分析対象物質抗体, 3...分析対象物質, 4...標識, 5...抗分析対象物質抗体, 6...標識結合物質, 7...酵素, 8...酵素基質, 9...主な分析対象となる酵素反応生成物, 10...主な分析対象とならない酵素反応生成物, 20...検体供給部, 21...検体容器, 22...検体分注装置, 23...ノズル洗浄機構, 30...反応テーブル, 31...反応容器, 32...吸引ノズル, 33

50

... ノズル洗浄機構，34... 洗浄液供給ノズル，35... ノズル洗浄機構，40... 反応容器移送部，
 41... 反応容器ストッカー，42... 終了反応容器収納部，50... 試薬供給ノズル，51... 試薬容器，
 52... ノズル洗浄機構，53... 試薬テーブル，60... 試料注入ノズル機構，61... ノズル洗浄機
 構，62... 分析試料テーブル，63... 分析試料容器，70... LC/MS試料注入部，71... LC/MS

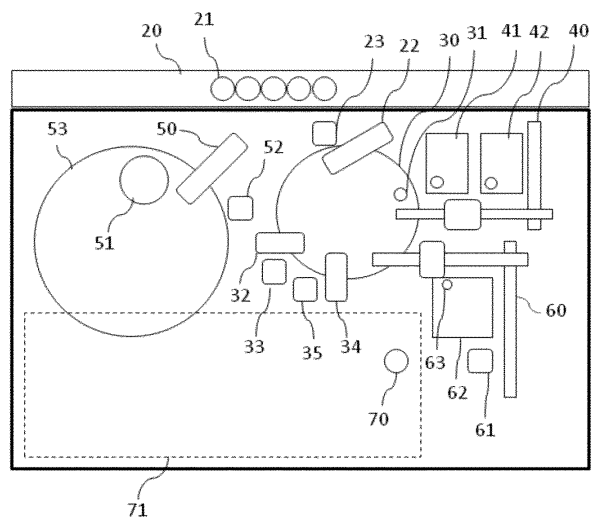
【図1】

図1

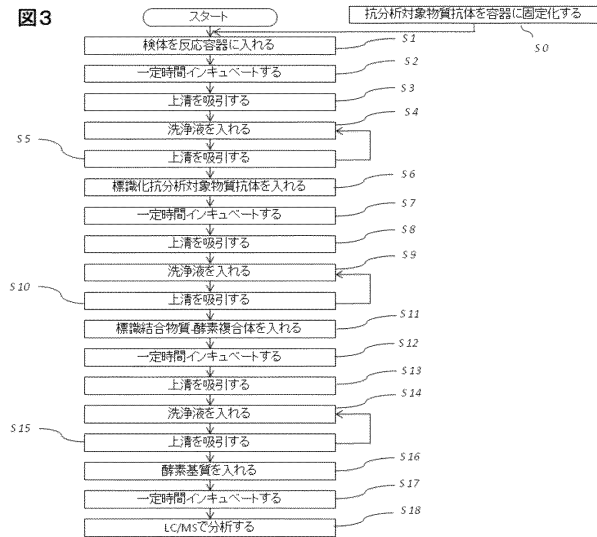


【図2】

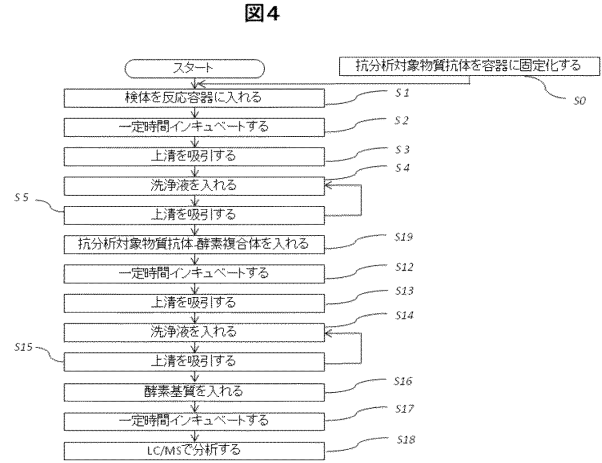
図2



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(56)参考文献 特表2001-524808(JP,A)
特開2014-210761(JP,A)
特開2006-180813(JP,A)
特表2002-523058(JP,A)
米国特許第4876191(US,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

G01N 27/62

专利名称(译)	分析方法和分析仪		
公开(公告)号	JP6482577B2	公开(公告)日	2019-03-13
申请号	JP2016567300	申请日	2015-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社日立高新技术		
申请(专利权)人(译)	日立高新技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	日立高新技术公司		
[标]发明人	中川裕章		
发明人	中川 裕章		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N27/62		
CPC分类号	G01N33/543 C12Y302/01023 G01N33/54306 G01N33/6848 G01N2333/924 G01N2333/94 G01N2560 /00 H01J49/4225		
FI分类号	G01N33/543.545.A G01N33/53.U G01N27/62.V		
优先权	2014267008 2014-12-29 JP		
其他公开文献	JPWO2016108267A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了使用酶免疫测定的高度准确的分析方法。与固定在固定相1上的分析物3特异性结合的酶7与与酶7结合的抗体5结合，酶7与抗体5结合。通过分析由物质产生的酶底物8的分解并用质谱仪分析分解产物9和10来检测或分析分析物3的存在。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6482577号 (P6482577)
(45) 発行日 平成31年3月13日 (2019. 3. 13)	(24) 登録日 平成31年2月22日 (2019. 2. 22)	
(51) Int. Cl. F 1		
G O 1 N 33/543 (2006.01) G O 1 N 33/543 5 4 5 A		
G O 1 N 33/53 (2006.01) G O 1 N 33/53 U		
G O 1 N 27/62 (2006.01) G O 1 N 27/62 V		
請求項の数 4 (全 11 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-567300 (P2016-567300)	(73) 特許権者 501387839	
(86) (22) 出願日 平成27年12月4日 (2015. 12. 4)	株式会社日立ハイテクノロジーズ	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2015/084113	東京都港区西新橋一丁目2 4 番 1 4 号	
(87) 国際公開番号 W02016/108267	(74) 代理人 110000350	
(87) 国際公開日 平成28年7月7日 (2016. 7. 7)	ボレール特許業務法人	
審査請求日 平成28年6月16日 (2017. 6. 16)	(72) 発明者 中川 裕章	
(31) 優先権主張番号 特願2014-267008 (P2014-267008)	日本国東京都港区西新橋一丁目2 4 番 1 4 号	
(32) 優先日 平成26年12月29日 (2014. 12. 29)	株式会社日立ハイテクノロジーズ内	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	審査官 赤坂 祐樹	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 分析方法、及び分析装置		